第37卷 第3期 昆 虫 学 报 Vol. 37, No. 3
1994年8月 ACTA ENTOMOLOGICA SINICA Aug., 1994

家蝇卵巢在体外培育中摄取卵黄蛋白*

龚 和 郑文惠
(中国科学院动物研究所，北京 100080)

摘要 本文报道家蝇 *Musca domestica* 卵巢在体外培养条件下，摄取异硫氰萤光素标记的家蝇卵黄蛋白的特点。用 Grace's 培养液标记蛋白浓度为 2mg/ml，在27℃条件下培养2小时，卵巢摄取量依赖于培养液中卵黄蛋白浓度和温度，摄取高峰在羽化后48小时，正值卵母细胞发育阶段进入6—8时期。培养液中加入 JHIII，能促进摄取，JHIII 的浓度和摄取量无明显相关性。乌本苷、牛血清蛋白和叠氮钠显著抑制卵巢的摄取活动。

关键词 家蝇 卵黄蛋白 保幼激素

昆虫卵黄发生包括二个既独立又相关的过程，即卵黄原蛋白的合成和卵母细胞摄取、沉积卵黄的过程，当后者完成时，卵已成熟而进入产卵期。早在1960年 Telfer 首先提出了卵母细胞是通过胞吞作用从血浆蛋白质中选择性地摄取卵黄原蛋白，在卵内沉积为卵黄蛋白。Roth 等(1964)在埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 卵成熟过程中观察了胞吞过程的细胞形态学变化，观察到了被膜小凹和被膜液泡等超微结构，最早证明了细胞摄取生物大分子的途径。以后又分别在蝗虫 *Locusta migratoria migratorioids*、埃及伊蚊、蜚蠊 *Nauphoeta cinerea*、惜古比天蚕蛾 *Hyalophora cecropia* 分别从细胞超微结构和摄取活动的生物化学途径对卵母细胞摄取卵黄蛋白的过程及其调控机理进行了一系列研究，证明卵母细胞摄取卵黄蛋白是通过受体调节的内吞作用 (Receptor-mediated endocytosis)。Ferenz (1990)已从蝗虫卵小管膜制备物中分离纯化了卵黄蛋白受体。

卵巢在体外进行短期培养，研究卵母细胞的摄取活动特性及其各种因子对胞吞作用的调控，一般均采用同位素标记的卵黄蛋白作为探针 (Raikhel, 1992)。Adams 和 Eide(1972) 用体外培养家蝇卵巢的方法来研究 JHA 对滤泡和卵母细胞生长的影响。本实验用萤光素标记家蝇 *Musca domestica* 卵黄蛋白，建立研究家蝇卵巢摄取活动的方法和研究激素等因子对摄取活动的影响。

材料和方法

一、试剂

Grace' 昆虫培养液：KC Biological 公司出品。

异硫氰萤光素 FITC：德国 E. Merck 公司出品。

保幼激素 III 和 20-羟基蜕皮酮：美国 Sigma 公司产品。

二、方法

本文于1993年2月收到。
* 国家自然科学基金资助项目。

1. 家蝇的饲养和收集　按龚和和李乾君(1992)方法。

2. 卵黄蛋白的分离和萤光标记

从家蝇成熟卵巢中分离纯化得到卵黄蛋白（按龚和和李乾君 1992 年方法)。进行萤光标记方法时，称取 20mg 卵黄蛋白溶于 5ml 家蝇缓冲液中（pH8.0，含 0.05mol/L Tris-HCl、0.5mol/L NaCl、1mmol/L PMSF、5mmol/L $NaHCO_3$)在冰浴中边搅拌边加入 6mgFITC粉，然后继续搅拌 5—6 小时，最后按纯化卵黄蛋白的方法反复沉淀和溶解，去掉游离的 FITC，得到桔红色的萤光标记蛋白，再测定蛋白质总量和每单位蛋白的萤光 OD 值，计算出比活。萤光测定使用意大利 Optica 萤光分光光度计 115 型，使用激发波长 502nm，夹缝 1.2，发射波长 528nm，夹缝 1.8。

3. 家蝇卵巢的离体培养和摄取卵黄蛋白的测定

家蝇麻醉后，用 $HgCl_2$ 溶液表面灭菌，用无菌水洗涤三次，然后在家蝇生理盐水中解剖出卵巢(生理盐水为 pH8.0，128mmol/L NaCl、1.3mmol/L KCl，134mmol/L 蔗糖、1.8mmol/L $CaCl_2$、24mmol/L $NaHCO_3$)，Grace′ 培养液用 1mol/L KOH 调节 pH 为 6.5，加入萤光标记卵黄蛋白，使其浓度为 1.5—2μg/μl 培养液，一般在含有 200μl 培养液的培养小碟中培养 2 对卵巢，培养温度为 27℃，培养过程中保持低速振荡，培养结束后取出卵巢并用 PBS 缓冲液洗涤 3 次，然后在一定量的 PBS 缓冲液中匀浆，之后离心 5 分钟，取出 50μl 上清液作为样品测萤光 OD 值，最后换算成每对卵巢摄取卵黄蛋白的量。

4. 蛋白质测定　以牛血清蛋白为标准，用 BiO-RAD 公司的蛋白质颜色反应试剂，在 595nm 测 OD 值。

结　果　与　讨　论

1. 最适培养条件

在 200μl Grace′ 培养液中加入 3μl 1mol/L KOH，10μl FITC 标记的家蝇卵黄蛋白(浓度为 36μg 蛋白/μl)，这样培养体系的 pH 为 7，卵黄蛋白浓度为 1.7μg/μl，培养 2 对羽化后 48 小时的家蝇卵巢，分别培养 15、30、45 分钟和 1、2、3、4 小时。图 1 结果表明，卵巢培养 15 分钟后已明显有摄取量，在 15 分钟到 2 小时间摄取量成直线上升，2小时后每对卵巢可以摄取 4—5μg 卵黄蛋白，2 小时后摄取量没有明显增加，其卵巢摄取能力降低的主要原因可能是经长时间培养，使培养液 pH 值改变而培养液出现沉淀，从而影响了卵巢活性和摄取功能，所以其它实验均选择 2 小时培养作为最适时间。

图 2 比较了卵巢在 4℃和 27℃培养温度时的摄取能力，27℃条件下的摄取能力比4℃时大一倍，Oliveira等(1986)应用 ^{32}P 标记的卵黄蛋白观察了吸血蝽 *Rhodnius prolixus* 卵巢摄取卵黄蛋白的温度效应，表明 28℃时其摄取能力远远大于 4℃，说明卵巢摄取活动是和它的代谢活力密切相关。

图 3 表示培养液中具有不同卵黄蛋白浓度时，卵巢的摄取量与卵黄蛋白浓度在10μg/μl 以上呈一定的线性关系。但培养液中卵黄蛋白浓度过高，会影响卵黄蛋白的溶解度和培养液 pH，所以一般测定选择 2μg/μl 卵黄蛋白为最适浓度。

2. 不同发育期卵巢的摄取能力

家蝇卵黄发生规律的研究表明，家蝇卵黄蛋白在体内合成和释放到血淋巴中是在羽

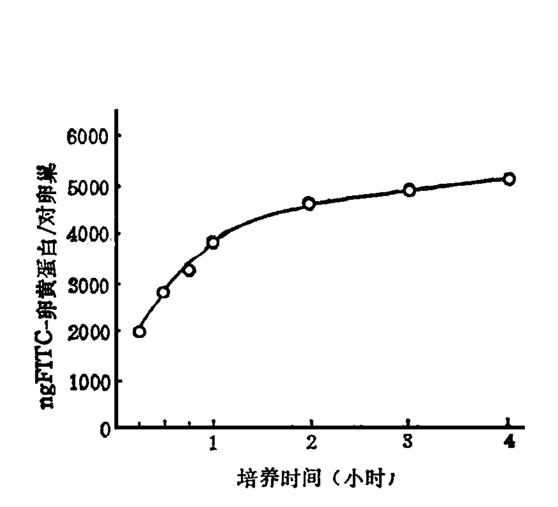


图1 家蝇卵巢在体外培养下，不同时间卵巢摄取 FITC-卵黄蛋白的量

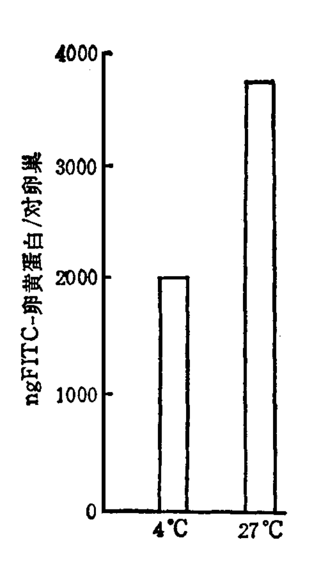


图2 家蝇卵巢在不同温度条件下，卵巢摄取 FITC-卵黄蛋白的量

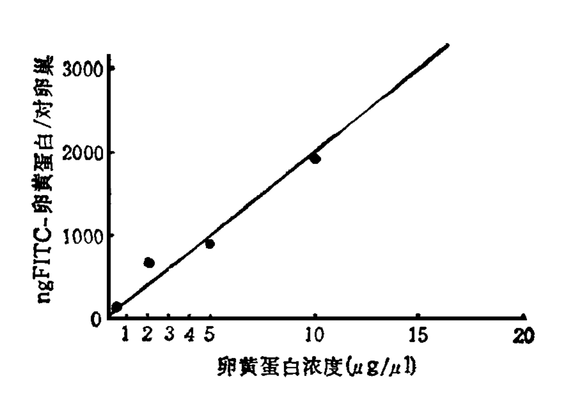


图3 培养液中不同的 FITC-卵黄蛋白浓度对摄取的影响

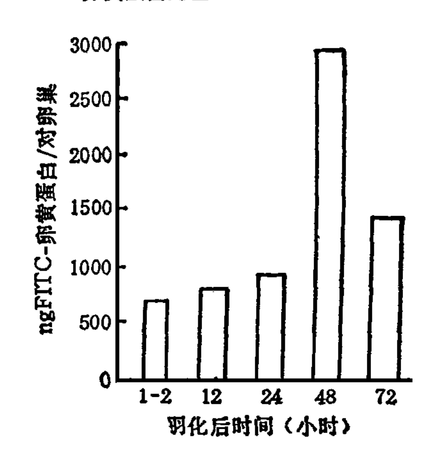


图4 羽化后不同时间家蝇卵巢摄取 FITC-卵黄蛋白的量

化后 24 小时后，在卵巢中开始沉积是在羽化后 30 小时，图 4 表示家蝇羽化后不同时间其卵巢的摄取能力，结果表明羽化后 48 小时的卵巢摄取能力最大，说明离体条件下观察和体内分析结果是一致的。

家蝇卵母细胞从发育开始到卵成熟可分成 10 个时期，图 5 又按卵母细胞发育阶段测定其摄取能力，在第 4 时期前仅有少量摄取，第 4 时期后开始大量摄取，第 6、7、8 时期是摄取进入高峰阶段，然后摄取能力迅速下降，卵母细胞 6、7、8 时期一般在羽化后48—60小时，正处在卵黄发生盛期，上述结果表明离体条件下家蝇滤泡摄取能力和体内实验的结果是一致的(龚和和李乾君，1992)。

3. 激素等因子对摄取活动的影响

家蝇卵黄发生过程中，保幼激素和20-羟基蜕皮酮都参与调节作用已有很多研究报道

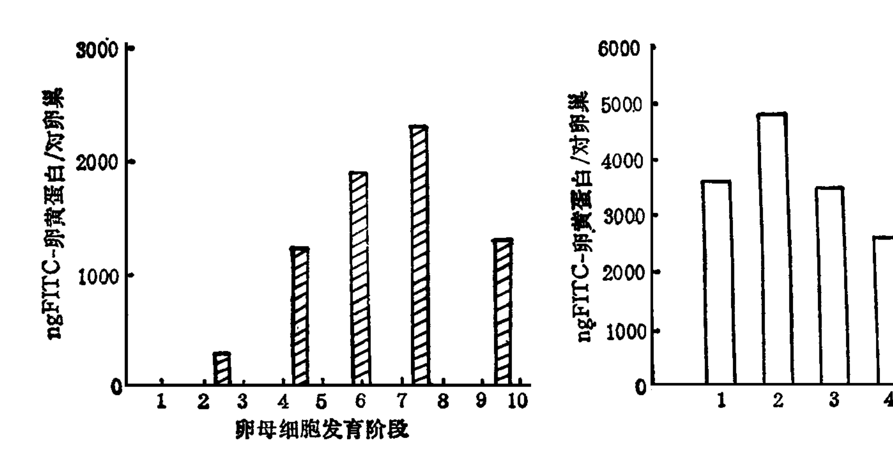


图 5　家蝇不同发育期卵母细胞摄取卵黄蛋白的能力

图 6　培养液中加入各种成分对卵巢吸收的影响
1.对照 2.JHIII(58ng/μl) 3.20-羟基蜕皮酮 (111ng/μl) 4.乌本苷 (10mmol/L) 5. BSA(5μg/μl) 6.叠氮钠 (1mol/L)

(Adams 等，1974、1985、1988，龚和和李乾君，1992)。在培养液中直接加入激素等因子，观察这些因子对卵巢摄取能力的影响，图 6 表示 JHIII、20-羟基蜕皮酮、乌本苷、牛血清蛋白和叠氮钠对摄取的影响。结果表明，JHIII 有明显的促进摄取作用，这一结果和 Davey (1981)、Abu-Hakima 等 (1977b) 龚和等 (1993) 证明 JH 可以增加滤泡开放作用，可以提高细胞中 Na^{+}-K^{+} ATP 酶的活性是一致的。图 7 表示培养中不同的 JH 浓度对摄取的影响，从 5.9—117.3ng/μl 范围内均有明显的促进摄取作用，但摄取能力和 JH 浓度没有明显相关性，说明激素的作用是全或无现象，这一结果与 Adams 和 Eide (1972) 用 JHA 培养卵巢的结果是一致的，当 JHA 的浓度从 0.2—1.8μg/μl 时，对卵室的增长效应没有明显差异。图 6 说明20-羟基蜕皮酮对摄取无明显作用，蜕皮激素是否参与卵母细胞摄取活动的调节，至今还未见报道。乌本苷 (ouabain) 作为 Na^{+}-K^{+} ATP酶的抑制剂，具有抑制细胞内吞作用而影响卵巢摄取活动；牛血清蛋白在高浓度条件下也影响卵母细胞特异性摄取卵黄蛋白。一般情况下昆虫卵母细胞可以从昆虫各种血淋巴蛋白中特异摄取卵黄蛋白，但昆虫卵母细胞摄取活动中也具有非特异性摄取 (Raikhel 和 Lea, 1986)，牛血清蛋白非特异摄取为什么能强烈影响这种特异性摄取还有待进一步研究。叠氮钠作为代谢抑制剂也明显抑制细胞的摄取活动。上述这些因子对摄取活动的作用，还需进一步对作用剂量和作用机理方面作进一步探索。

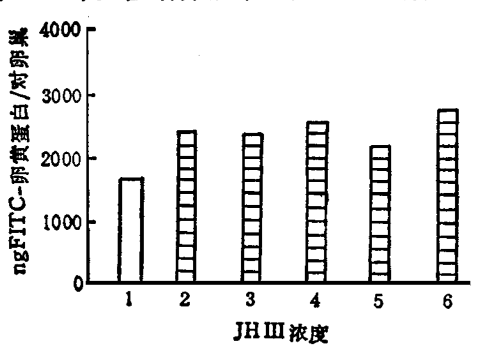


图 7　培养液中 JHIII 浓度对卵巢摄取蛋白的影响
1.对照 2. 5.9ng/μl 3. 17.6ng/μl 4. 29.3ng/μl 5. 58.7ng/μl 6. 117.3ng/μl

参 考 文 献

龚和、李乾君 1992 家蝇卵黄发生及其激素调节。昆虫学报 35(2)129—37。

龚和等 1994 家蝇卵巢摄取卵黄蛋白的机理。昆虫学报 37(1)8—15。

Abu-Hakima, R. & Davey, K. G. 1977 The action of juvenile hormone on follicle cells of *Rhodnius prolixus* in vitro: The effect of colchinine and cytochalasin B. *Gen. Comp. Endocr.* **32**: 360—70.

Adams, T. S. & P. E. Eide 1972 A method for the *in* vitro stimulation of house fly egg development with a juvenile hormone analog. *Gen. Comp. Endocr.* **18**: 12—21.

Adams, T. S. 1974 The role of juvenile hormone in housefly ovaries follical morphogenesis. *J. Insect Physiol.* **20**: 263—74.

Adams, T. S. et al. 1985 Haemolymph ecdysteroid in the housefly, *Musca domestica*, during oogenesis and its relationship with vitellogenin levels. *J. Insect Physiol.* **31**: 91—7.

Adams, T. S. & P. A. Filipi 1988 Interaction between JH, 20-hydroxyecdysone the corpus-allatum complex and ovaries in regulation vitellogenin levels in the housefly, *Musca domestica. J. Insect Physiol.* **34**: 11—9.

Davey, K. G. 1981 Hormonal control of vitellogenin uptake in *Rhodnius prolixus* (Stål). *Am. Zool.* **21**: 701—5.

Ferenz, H. J. 1990 Receptor-mediated endocytosis of insect yolk protein. Hagedorn, H. H. et al. eds. In Molecular Insect Science. Plenum Press, New York.

Oliveira, P. L. et al. 1986 Uptake of yolk proteins in *Rhodnius prolixus. J. Insect Physiol.* **32**: 859—66.

Raikhel, A. S. & A. O. Lea 1986 The specific ligand, vitellogenin, directs internalized proteins into accumulative compartments of mosquito oocytes. *Tissue Cell* **18**: 559—74.

Raikhel, A. S. 1992 Accumulation of yolk protiins in insect oocytes. *Ann. Rev. Entomol.* **37**: 217—51.

Roth, T. F., K. R. Porter & S. B.Atlas 1964 Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquito *Aedes aegypti. J. Cell Biol.* **20**: 313—32.

Telfer, W. H. 1960 The selective accumulation of blood proteins by the oocytes of saturniid moths. *Biol. Bull.Mar. Biol. Lab. Woods Hole* **118**: 338—51.

UPTAKE OF YOLK PROTEIN BY HOUSEFLY OVARIES *IN VITRO*

GONG HE ZHENG WEN-HUI

(*Institute of Zoology, Academia Sinica, Beijing* 100080)

Experiments were performed to study the incorporation of yolk protein labelled with FITC into housefly follicles *in vitro*. It was revealed that the rate of yolk protein incorporation depended on the concentration of yolk protein in the culture medium and temperature. The optimal condifion for yolk protein incorporation in this Grace's medium was 2 mg yolk protein per ml culture medium at 27℃ for two hours. The capacity of follicles in yolk protein uptake reached summit when housefly ovaries developed to the stage 6—8 about 48 hours after adult emergence. JH III, if added to the culture medium at concentration of 5.9 to 117.3 ng/μl, could increase the amount of yolk protein incorporated into ovarian follicles. The yolk protein uptake by follicles *in vitro* was inhibited by ouabain, BSA or NaN_3.

Key words *Musca domestica*——yolk protein——juvenile hormone